



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **49407** (13) **C2**  
(51) **МПК (2006)**  
**C12N 1/04**  
**C12N 13/00**  
**A61K 39/04**  
**C12R 1/32 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) СПОСІБ ПІДТРИМКИ ПРОТЕЇНОГЕННОСТІ ТА ОДНОРІДНОСТІ ВИРОБНИЧИХ КУЛЬТУР АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА АНТИГЕНУ З АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ (ААМ)**

1

(21) 2001128240  
(22) 03.12.2001  
(24) 15.02.2006  
(46) 15.02.2006, Бюл. № 2, 2006 р.  
(72) Кассіч Володимир Юрійович, Кассіч Юрій Якович, Завгородній Андрій Іванович  
(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
(56) Стейниер Р. и др. Мир микробов // М.- "Мир", 1979, Т.1.- с.37-40.  
RU 2139089 С1, 10.10.1999  
UA 31081 А, 15.12.2000

2

(57) Спосіб підтримки протеїногенності та однорідності виробничих культур атипових мікобактерій для виробництва антигену з атипових мікобактерій (ААМ), що включає одержання моноклонів виробничих штамів методом "виснажуючого" посіву та перевірку їх протеїногенності з подальшим відбором типових, протеїногенних клонів, який **відрізняється** тим, що ефекту "виснажуючого" посіву досягають шляхом розведення культур мікобактерій до концентрації  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  та опроміненням їх гама-променями у дозах 100 - 300 тис. Р з потужністю дози – 400 Р/год.

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарної мікробіології та біотехнології.

При виробництві антигену з атипових мікобактерій (ААМ), щорічно перевіряють однорідність, відсутність дисоціації та протеїногенність (вміст протеїну в моноалергенах) виробничих штамів атипових мікобактерій [M.scrofulaceum №31/82, M.intracellulare №78/98]. Якщо встановлюють зміни в особливостях росту та протеїногенності виробничих культур, їх виключають з виробництва, замінюючи свіжопасажованими моноклонами або заново виділеними і перевіреними ізолятами.

Існує спосіб підтримки та перевірки культуральних, біологічних, протеїногенних властивостей та однорідності виробничих культур збуднику туберкульозу для виробництва ГШД-туберкуліну для ссавців. Це пасажування виробничого (туберкуліногенного) штаму збудника туберкульозу в організмі великої рогатої худоби (п.3.3. Іструкції по виготовленню й контролю туберкуліну очищеного для ссавців (ППД) в стандартному розчині.-Харків, 2001). Згідно "Іструкції" при виробництві туберкуліну туберкуліногенність та належність до виду штамів визначають через 2...3 роки. Через 4...5 років культури виробничих штамів піддають пасажу в організмі здорової великої рогатої худоби.

Якщо встановлюють зміни в особливостях росту, патогенності та туберкуліногенності культур виробничих штамів, їх виключають з виробництва, замінюючи свіжопасажованими або новими виділеними і перевіреними придатними для виготовлення туберкуліну штамми збуднику туберкульозу бичачого виду.

Процес підтримання культуральних, біологічних та протеїногенних властивостей атипових мікобактерій ускладнюється тим, що атипові мікобактерії не патогенні для лабораторних тварин та великої рогатої худоби і тому їх біологічні властивості не можуть бути відновлені біологічним методом - проведенням через організм чутливих тварин, як це передбачається при виробництві туберкуліну.

Відомо, що в процесі пасажування на живильних середовищах біологічні властивості культур мікроорганізмів змінюються, вірулентність слабшає, відзначається дисоціація культур. Дисоціативні зміни особливо часто спостерігаються при довгому зберіганні культур [Ветеринарна мікробіологія /П.А. Ємел'яненко, Г.В. Дунаєв, Д.Г. Кудлай та ін.; "Колос", 1982 - 304с.]. При цьому в дисоційованих культурах одночасно існують як S-, так і R- форми мікроорганізмів, які можна відокремити одержан-

(19) **UA** (11) **49407** (13) **C2**

ням популяцій окремих клітин (моноклонів) [Стейнер Р. Дцельберг Е., Ингрэм Дж. /Світ мікробів. Т.1,1979,М. -"Мир". - с.41].

Існують способи одержання чистих бактерійних культур (тобто клонів) методом посіву на чашки штрихом і методом розведень [Стейнер Р., Едельберг Е., Ингрэм Дж. /Світ мікробів.Т.1,1979,М.-"Мир". - с.37-40].

Посів на чашки штрихом робиться таким чином. Стерилізовану зігнуту проволоку занурюють в розведену завись мікроорганізмів і потім проводять нею ряд паралельних розділених штрихів, що не доторкаються одне до одного, по поверхні застиглого слою агару в чашці Петрі. При кожному наступному штриху здійснюється поступове розведення інокуляту, так що навіть якщо перші штрихи дадуть суцільний ріст, впродовж наступних штрихів будуть рости окремі колонії. Недоліком методу є те, що одержані таким чином колонії можуть бути не чистими клонами.

Одержання чистих культур мікроорганізмів в рідких середовищах здійснюється методом розведень. Інокулят послідовно розводять стерильним рідким середовищем і аліквотами з кожного розведення засівають велику кількість пробірок з середовищем. Мета цієї операції -інокулювати ряд пробірок настільки розведеною суспензією мікроорганізмів, щоб вірогідність внесення в певну пробірку навіть однієї мікробної клітини була досить малою (порядку 0,05). Якщо таким розведеним інокулятом засівається багато пробірок, то по теорії вірогідності можна вилічити, що в 95 % усіх засіяних пробірок не попадає ні однієї мікробної клітини. По одній особі попадає в 4,8 % пробірок, по дві - в 0,12% пробірок, а в 0,002 усіх засіяних пробірок попаде по три особи. Тому, якщо в пробірці помітно ріст, то скоріше за все цей ріст обумовлено попаданням в неї всього одного мікроорганізму. Вірогідність цього становить

$$0,48$$

$$0,048 + 0,0012 + 0,00002 = 0,975$$

Вірогідність того, що ріст викликано попаданням в пробірку лише одного організму, знижується з підвищенням середнього числа клітин в інокуляті. Тому важливо, щоб виділення проводилось з тієї серії пробірок, де в переважній більшості випадків не відзначають росту. Метод дуже об'ємний, трудоемкий, потребує багато стерильного лабораторного посуду та елективних середовищ. Його можна використовувати лише для виділення чистих культур в змішаній популяції мікроорганізмів.

За результатами наших досліджень ефекту "виснажуючого" посіву можна досягти також шляхом опромінення культур мікобактерій гамма-випромінюванням в діапазоні доз: 100тис.-600тис.Р ("пригнічуючі" та "стерилізуючі" дози). При цьому настає репродуктивна загибель частини мікробних клітин і після висіву опромінених культур на елективні живильні середовища відзначають ріст поодиноких колоній, які розвиваються з окремих мікробних клітин.

В основу винаходу, що передбачається, поставлено завдання розробити спосіб підтримки й перевірки протеїногенності та однорідності вироб-

ничих культур атипичних мікобактерій з використанням методів одержання їх моноклонів та подальшим визначенням культуральних властивостей, протеїногенності та відбором найтиповіших клонів.

При реалізації способу підтримки й перевірки протеїногенних властивостей та однорідності культур атипичних мікобактерій для виробництва антигену з атипичних мікобактерій (ААМ) поставлена мета досягається одержанням моноклонів виробничих штамів мікроорганізмів з використанням різних методів. Клонування виробничих штамів атипичних мікобактерій досягається способом виснажуючих посівів, який здійснюється методами послідовних розведень та (або) впливом пригнічуючих ріст мікобактерій доз гамма-випромінювання. З одержаних моноклонів відбирають типові за характером росту колонії в S-формі, з них, згідно схеми технологічного процесу, готують моноалергени, в яких визначають кількість білку по К'ельдалю та відбирають найпротеїногенніші. Таким чином досягається контроль однорідності і підтримка протеїногенності виробничих культур.

Приклад 1. Посів виробничих штамів на щільне живильне середовище для культивування мікобактерій (ТУУ 46.15.063-95) здійснювали штрихом за модифікованою нами методикою. Стерилізований фломбуванням бактеріологічний шпатель вносили в бактеріальну масу кожного виробничого штаму мікобактерій, після чого зигзагообразно проводили їм по поверхні елективного щільного живильного середовища в бактеріологічній пробірці. Результати дослідження термінів та характеру росту і культуральних властивостей одержаних культур наведені в таблиці. З матеріалів таблиці видно, що при посіві штрихом окремих колоній (моноклонів) виробничих культур не було одержано.

Приклад 2. Посів виробничих штамів методом послідовних розведень на щільне живильне середовище для культивування мікобактерій здійснювали за модифікованою нами методикою з розведень  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  мг бактерійної маси в  $1\text{см}^3$  фізрозчину. Розведення мікобактерій виробничих штамів робили таким чином. Стерильним бактеріологічним шпателем знімали з живильного середовища бактеріальну масу кожної виробничої культури атипичних мікобактерій і вміщували її у окремий стерильний флакон з бусами, попередньо зваженим на аналітичних вагах. Флакони з бактеріальною масою знову зважували на аналітичних вагах. Різниця між вагою флакона з культурою і порожнього є вагою наважки бактеріальної маси. Наважку бактеріальної маси гомогенізували у флаконі з бусами в стерильному фізрозчині (рН  $7,0 \pm 0,2$ ) з розрахунку  $1\text{см}^3$  фізрозчину на 1мг бакмаси. По  $1\text{см}^3$  одержаної зависі кожного виробничого штаму переносили в пробірки, в які попередньо вливали по  $9\text{см}^3$  стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію. Таким чином було одержано розведення  $10^{-1}$ . По  $1\text{см}^3$  цього розведення кожної виробничої культури переносили в другу пробірку з  $9\text{см}^3$  фізрозчину, з другої пробірки  $1\text{см}^3$  суміші переносили в третю, з третьої - в четверту з  $9\text{см}^3$  фізіологічного розчину, в якій одержували розведення  $10^{-4}$ . З четвертого розведення кожної виробничої культури по  $1\text{см}^3$  зависі переносили в

п'яту пробірку з 9мл фізрозчину, з п'ятої 1мл рідини вносили в шосту пробірку, одержуючи таким чином розведення  $10^{-5}$  та  $10^{-6}$ . При виготовленні кожного наступного розведення використовували окрему стерильну піпетку, а мікробні суміші ретельно змішували.

Завись бактеріальної маси виробничих штамів з розведень  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  висівали на поверхню щільного живильного середовища для культивування мікобактерій в 10 пробірок по 0,1см<sup>3</sup> в кожную. Пробірки поміщали в термостат в нахиленому положенні на 24 години. Через 24 години пробки пробірок заливали парафіном. Посіви в бактеріологічних штативах інкубували в термостаті при +37°C протягом 4 тижнів. Проглядали посіви через 3-5 діб. Матеріали дослідження термінів та характеру росту і культуральних властивостей одержаних культур-клонів наведені в таблиці. Результати досліджень свідчать про те, що при висіві з розведень  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  виробничі культури атипівних мікобактерій ростуть поодинокими колоніями-моноклонами. Кожна така колонія розвивається з однієї мікробної клітини і являє собою клон мікобактерій. Дослідженнями різних клонів доведено, що їх культуральні властивості та протеїногенність не відрізняються від аналогічних показників вихідних виробничих штамів (вихід білку не нижче ніж у вихідних культур), що свідчить про однорідність та протеїногенність культур.

Приклад 3. Висіви виробничих штамів атипівних мікобактерій на щільне живильне середовище методом виснажуючого посіву з використанням радіаційної техніки здійснювали з розведення 1мг бактеріальної маси в 1см<sup>3</sup> стерильного фізрозчину після попередньої обробки посівного матеріалу пригнічуючими дозами гамма-променів. Для цього бактеріальну масу виробничих культур атипівних мікобактерій, вирощену на середовищі Сотона та (або) на середовищі для культивування мікобактерій (ТУУ 46.15.063-95) з додаванням ростових факторів бактеріологічною петлею вносили в стерильні бактеріологічні пробірки, закривали гумовими пробками, які закріплювали пластиром. Пробірки з бакмасою розміщали в металевому контейнері і в такому стані піддавали опроміненню на гамма-випромінювачі "Исследователь" (джерело випромінювання <sup>90</sup>Со, потужність дози: Р=400Р/год.) в дозах 100000, 300000 та 600000Р. Після опромі-

нення бактеріальну масу кожної виробничої культури атипівних мікобактерій і вносили в окремий стерильний флакон з бусами, попередньо зважений на аналітичних терезах. Флакони з бактеріальною масою знову зважували на аналітичних терезах. Різниця між вагою флакона з культурою і порожнього є вагою наважки бактеріальної маси. Наважку бактеріальної маси гомогенізували у флаконі з бусами в стерильному фізрозчині (рН 7,0±0,2) з розрахунку 1см<sup>3</sup> фізрозчину на 1мг бакмаси.

Завись бактеріальної маси виробничих штамів з розведення 1мг/см<sup>3</sup> висівали на поверхню щільного живильного середовища для культивування мікобактерій в 10 пробірок по 1,0см<sup>3</sup> в кожную. Пробірки поміщали в термостат в нахиленому положенні на 24 години. Через 24 години пробки пробірок з посівами парафінували над вогнем спиртівки. Посіви інкубували в термостаті при +37°C протягом 4 тижнів. Проглядали посіви через 3-5 діб. Матеріали дослідження термінів та характеру росту і культуральних властивостей одержаних культур-клонів наведені в таблиці. Результати досліджень свідчать про те, що при висіві виробничих культур атипівних мікобактерій, опромінених в дозах 100-300тис.Р відзначали ріст поодинокими колоніями-моноклонами. Кожна така колонія розвивається з однієї мікробної клітини і являє собою клон мікобактерій. Після опромінення дозою 600тис.Р росту мікобактерій на живильних середовищах не відзначали (репродуктивна загибель мікобактерій). Дослідженнями різних клонів виробничих штамів доведено, що їх протеїногенність та культуральні властивості не відрізняються від аналогічних показників у вихідних виробничих культур, що свідчить про однорідність та повноцінність культур.

Таким чином, використанням передбачених способів підтримки й перевірки протеїногенних властивостей та однорідності культур атипівних мікобактерій для виробництва антигену з атипівних мікобактерій (ААМ) досліджень досягається мета одержання моноклонів виробничих культур атипівних мікобактерій. Культуральні, біохімічні та протеїногенні дослідження моноклонів дають можливість контролювати однорідність, перевіряти та підтримувати культуральні властивості та протеїногенність виробничих культур.

Таблиця - Культуральні, біохімічні та протеїногенні властивості клонів виробничих штамів атипових мікобактерій

Приклади	Мікобактерії	Досліджено клонів	Початок росту (через діб)	Характер росту	Характеристика колоній (клонів)	Пігментування	Ріст на елективних середовищах при температурі(°C)			Ріст на МПА при температурі (°C)			Каталана активність (в мм)	Протеїногенність (Масова частка білка в ливина буті повинна бути 0,8±0,2мг/см <sup>3</sup> )
							22°	37°	45°	22°	37°	45°		
Приклад 1(посів штрихом)	M.scrofulaceum M.intracellularae	— —	8 6	Суцільний ріст	Моноклонів не одержано									
Приклад 2 (посів з розведень 10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-6</sup> )	M.scrofulaceum	5	8	Ріст поодинокими колоніями	S-форма (дрібні та середні,гладкі,вологі,слабо випуклі в'язкі пігментовані колонії)	жовтий пігмент	±	+	-	-	+	-	45 і вище	Протеїн огенний
	M.intracellularae	5	6	Ріст поодинокими колоніями	S-форма (гладкі, м'які, округлі, дрібні та середні, випуклі, не пігментовані колонії)	нема	±	+	+	-	±	-	до 25	Протеїн огенний
Приклад 3 (опромінення дозами 100-300* тис.Р)	M.scrofulaceum	5	8	Ріст поодинокими колоніями	S-форма (дрібні та середні,гладкі,вологі,слабо випуклі в'язкі пігментовані колонії)	жовтий пігмент	±	+	-	-	+	-	45 і вище	Протеїн огенний
	M.intracellularae	5	6	Ріст поодинокими колоніями	S-форма (гладкі, м'які, округлі, дрібні та середні, випуклі, не пігментовані колонії)	нема	±	+	+	-	±	-	до 25	Протеїн огенний

Примітка: \*— при опроміненні дозою 600 тис.Р росту мікобактерій на живильних середовищах не відзначали.